

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

Solu- ja molekyylibiologia

2014

Jaana Kivistö

# CYP19A1-GEENIN ILMENTYMINEN hARO-LUC- HIIRILLÄ RASVAKUDOKSISSA JA MESENKYMAALISISSA STROOMASOLUISSA

– Menetelmän optimointi



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Jaana Kivistö

# CYP19A1-GEENIN ILMENTYMINEN HARO-LUC-HIIRILLÄ RASVAKUDOKSISSA JA MESENKYMAALISISSA STROOMASOLUISSA – MENETELMÄN OPTIMOINTI

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli optimoida menetelmää, jota käytetään Turun yliopiston Bio-lääketieteen laitoksella Funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiskeskuksessa lusiferaasiaktiivisuuden määrittämiseen transgeenisten hARO-Luc –hiirten rasvakudoksesta ja mesenkymaalisista stroomasoluista. hARO-Luc-hiirimallissa on siirrettynä lusiferaasireportteri-geeniin yhdistetty ihmisen CYP19A1-geenin säätelyalue. hARO-Luc-hiirimallissa normaalin aromataasientsyymin tuotannon sijasta tuotetaan lusiferaasia. Geenin ilmentyminen voidaan siten määrittää lusiferaasiaktiivisuutta mittaamalla.

CYP19A1-geeni säätelee aromataasientsyymin tuotantoa sekä gonadeissa (kiveksissä ja munasarjoissa) että rasvakudoksessa ja muissa perifeerisissä kudoksissa. Aromataasientsyymi toimii osana estrogeenin tuotantoa. Erityisesti postmenopausaalisilla naisilla aromataasin ilmentymisen ja estrogeenin tuotannon nousun rintojen rasvakudoksissa on todettu esiintyvän rintasyövän kanssa samoilla alueilla.

Menetelmän optimointiin kuului hARO-Luc –hiiriltä kerättyjen maitorauhasten- ja gonadaalisten alueiden rasvakudoksien sekä reisi- ja sääriluiden luuytimien mesenkymaalisten stroomasolujen altistaminen 250 nM deksametasoni- ja 5 ng/ml TNF $\alpha$ -hoidoille sekä inkubaatioajan testaaminen 24:n, 48:n, 72 tunnin sekä 7 päivän jälkeen hoidoille altistamisesta. Rasvakudoksista ja mesenkymaalisista stroomasoluista analysoitiin lusiferaasiaktiivisuutta kaupallista määritysmenetelmää käyttäen.

Optimaaliseksi hoitojen inkubaatioajaksi määritettiin 24 tunnin inkubaatioaika sekä rasvakudoksille että mesenkymaalisille stroomasoluille.

## ASIASANAT:

Aromataasi, hARO-Luc – hiiri, mesenkymaalinen stroomasolu, rasvakudos

Jaana Kivistö

## CYP19A1 GENE EXPRESSION IN ADIPOSE TISSUE AND MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF HARO-LUC MICE – Optimizing the detection method

The purpose of this thesis was to optimize the method used in University of Turku, Functional Foods Forum for detecting the luciferase activity in adipose tissue and mesenchymal stromal cells of the transgenic hARO-Luc mice. The hARO-Luc mouse model contains a luciferase reporter gene that is connected to a human CYP19A1 gene regulatory region. Therefore in the hARO-Luc mouse model the normal aromatase enzyme production is substituted with luciferase production instead. Thus the gene expression can be determined by measuring luciferase activity.

The CYP19A1 gene regulates aromatase enzyme production both in the testis and the ovaries as well as in the adipose tissue and other peripheral tissues. Aromatase enzyme functions as a part of estrogen production. The increase of aromatase expression and estrogen production in areas of the breast adipose tissue (especially with postmenopausal women) is shown to correlate with the occurrence of breast cancer in the same areas.

The optimization of the method consisted of exposition of the collected mammary gland and gonadal fat tissues as well as the mesenchymal stromal cells of the femurs and tibias to the used dexamethasone and TNF $\alpha$  treatments and then testing incubation time with the options of 24, 48 and 72 hours as wells as 7 days after the exposition. Luciferase activity of the treatment exposed adipose tissues and mesenchymal stromal cells was then analyzed using a commercial detection method.

The optimal incubation time of the treatments was determined at 24 hours both with the adipose tissues and mesenchymal stromal cells.

### KEYWORDS:

Aromatase, hARO-Luc mouse, mesenchymal stromal cell, adipose tissue

# SISÄLTÖ

<b>SANASTO</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 OPINTÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT</b>	<b>9</b>
2.1 Aromataasi	9
2.2 CYP19A1-geeni	10
2.3 Estrogeenit	10
2.4 Estrogeeni rintasyövässä	11
2.5 hARO-Luc-hiirimalli	12
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT</b>	<b>14</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>16</b>
4.1 Opinnäytetyön toteutussuunnitelma	16
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	16
4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	17
4.4 Maitorauhasten- ja gonadaalisen rasvakudoksen kerääminen	18
4.5 Mesenkymaalisten stroomasolujen kerääminen	18
4.6 Käytetyt elatusaineet	19
4.7 Kuljettimen ja hoitojen laimentaminen	20
4.8 Menetelmän optimointi maitorauhasten- ja gonadaalisilla rasvakudoksilla	20
4.9 Menetelmän optimointi mesenkymaalisilla stroomasoluilla	21
4.10 Lusiferaasiaktiivisuuden mittaaminen	22
<b>5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>24</b>
5.1 Lusiferaasiaktiivisuus maitorauhasten- ja gonadaalisessa rasvakudoksessa koirashiirillä	24
5.2 Lusiferaasiaktiivisuus maitorauhasten rasvakudoksessa naarashiirillä	28
5.3 Lusiferaasiaktiivisuus mesenkymaalisissa stroomasoluissa koirashiirillä	30
5.4 Tulosten tarkastelu	32
<b>6 POHDINTA</b>	<b>33</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>35</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Lusiferaasiaktiivisuuden mittaus (työohje).  
Liite 2. Proteiinin määrittäminen (työohje).  
Liite 3. Mesenkymaalisten stroomasolujen elatusaine.

## KUVIOT

Kuvio 1. Aromataasin toiminta. Muokattu lähteen (Brodie 2002) kuvasta.	10
Kuvio 2. Koirashiirten maitorauhasen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg) ja keskihajonnan virhepalkit. Hoidot uusittiin kudosviljelmiin aina 24 tunnin välein.	25
Kuvio 3. Koirashiirten maitorauhasen rasvakudoksen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.	26
Kuvio 4. Koirashiirten gonadaalisen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg) ja keskihajonnan virhepalkit. Hoidot uusittiin kudosviljelmiin aina 24 tunnin välein.	27
Kuvio 5. Koirashiirten gonadaalisen rasvakudoksen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.	28
Kuvio 6. Naarashiirten maitorauhasen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg) ja keskihajonnan virhepalkit. Rasvakudokset olivat samassa elatusaineessa optimoinnin ajan.	29
Kuvio 7. Naarashiirten maitorauhasen rasvakudoksen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.	30
Kuvio 8. Mesenkymaalisten stroomasolujen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg proteiinia) ja keskihajonnan virhepalkit. Soluviljelmät olivat ensimmäiset 24 tuntia hoidoissa.	31
Kuvio 9. Mesenkymaalisten stroomasolujen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.	31

## KAAVAT

Kaava 1. Lusiferaasimittauksen reaktioyhtälö.	22
-----------------------------------------------	----

## SANASTO

BCA	bicinchonic acid assay, kolorimetrinen proteiinin määrittäminen
BSA	bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
CPU	counts per unit, lusiferaasiaktiivisuuden signaaliyksikkö
DTT	dithiothreitol, DL- ditiotreitoli
Glukokortikoidi	steroidihormoni, joka tumareseptoriin kiinnittyneenä siirtyy geenin promootorialueelle ja käynnistää transkription
HEPES	orgaaninen kahtaisioninen puskurointiaine
iFBS	fetal bovine serum, naudan sikiön seerumi
L-glutamiini	soluviljelyssä vaadittavaa aminohappo
Lusiferaasi	mm. tulikärpäsen valoreaktioon osallistuva, luminesenssia aiheuttava entsyymi
PP <sub>i</sub>	inorganic pyrophosphate, epäorgaaninen pyrofosfaatti
Postmenopausi	vaihdevuosisien jälkeinen vaihe
Promootori	geenin ensimmäisen eksonin edessä oleva DNA-alue, joka osallistuu keskeisesti kyseisen geenin säätelyyn
TNF $\alpha$	liukoinen sytokiini, joka mm. stimuloi geenien promootoreita

# 1 JOHDANTO

Aromataasi on entsyymi, joka on osana estrogeenin biosynteesiä (Strauss ym. 2009). Aromataasientsyymiä määrittää CYP19A1-geeni, joka esiintyy sekä gonadaalisissa kudoksissa että gonadaalisten kudosten ulkopuolella (Zhao ym. 2009). Entsyymi toimii katalysoimalla androgeenien muuttumista estrogeeneiksi (Termien määritelmät 2014). Postmenopausaalisilla naisilla estrogeenin tuotanto siirtyy gonadaalisien alueiden eli sukupuolirauhasten ulkopuolelle ja tapahtuu suurimmilta osin rasvakudoksen mesenkymaalisissa soluissa. Estrogeenin taso määräytyy siis pääosin rasvakudoksen määrän mukaan. Aromataasin ilmentymisen ja sitä kautta estrogeenin pitoisuuden nousun rintojen rasvakudoksen eri alueilla on todettu korreloivan rintasyövän esiintymisen kanssa samoilla alueilla. Tästä voidaan päätellä, että riski rintasyövän kasvulle ja kehitykselle kasvaa rasvakudoksen alueilla, joilla aromataasia ilmentyy enemmän. (Lääketieteen termit 2014, Simpson ym. 2002.)

Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella Funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiskeskuksessa käytetään hARO-Luc-hiirimallia, joka on transgeeninen (siirtogeeninen) eläinmalli, ihmisen CYP19A1-geenin säätelyn tutkimiseen. Hiirien oma cyp19a1-geeni ei ilmenny yhtä laajasti eri kudoksissa, kuten ihmisen CYP19A1-geeni ilmenee. Lisäksi hiiren aromataasigeenin säätely poikkeaa merkittävästi ihmisen aromataasigeenin säätelystä. Tämän takia tässä opinnäytetyössä käytetään hARO-Luc-hiirimallia, johon on siirretty lusiferaasireportterigeeniin yhdistetty ihmisen CYP19A1-geenin säätelyalue. Aromataasientsyymien sijasta tuotetaan lusiferaasia, jotta geenin ilmentyminen voidaan määrittää lusiferaasiaktiivisuutta mittaamalla. (Strauss ym. 2009.) Hoitojen, joilla CYP19A1-geenin ilmentymistä tässä opinnäytetyössä stimuloidaan, tiedetään entuudestaan stimuloivan CYP19A1-geenin ilmentymistä rasvakudosspesifisen I.4-promootterin kautta. Näitä hoitoja ovat TNF $\alpha$  (tuumorinekroositekijä alfa) sekä deksametasoni (glukokortikoidi). (Simpson ym. 2002.)

Tässä opinnäytetyössä pyritään optimoimaan lusiferaasiaktiivisuuden mittaamiseen käytetyn menetelmän inkubaatioajat siinä käytetyille transgeenisten hA-RO-Luc -hiirten maitorauhasen rasvakudokselle ja gonadaaliselle rasvakudokselle sekä hiirien luuytimistä eristetyille mesenkymaalisille stroomasoluviljelmille. Mesodermistä muodostuvaa alkeiskudosta kutsutaan mesenkyymiksi ja siitä peräisin olevia soluja kutsutaan mesenkymaalisiksi soluiksi. Mesenkymaaliset solut erilaistuvat muun muassa tukikudoksen- ja veren soluiksi. (Heino & Vuento 2009; Lääketieteen termit 2014.) Rasvakudosten vastetta viljelyolosuhteissa testataan kahdella eri tavalla: 1) määrittämällä kauanko rasvakudokset kestävät pelkässä elatusaineessa säilyttäen vasteensa CYP19A1-geenin ilmentymistä stimuloiville tekijöille ja 2) kauanko lusiferaasiraportoiageenin aktiivisuus on mitattavissa rasvakudoksissa CYP19A1-geenin stimulaation jälkeen. Mesenkymaalisten stroomasolujen soluviljelmistä testataan, kauanko lusiferaasiraportoiageenin aktiivisuus on mitattavissa soluviljelmissä CYP19A1-geenin stimulaation jälkeen.

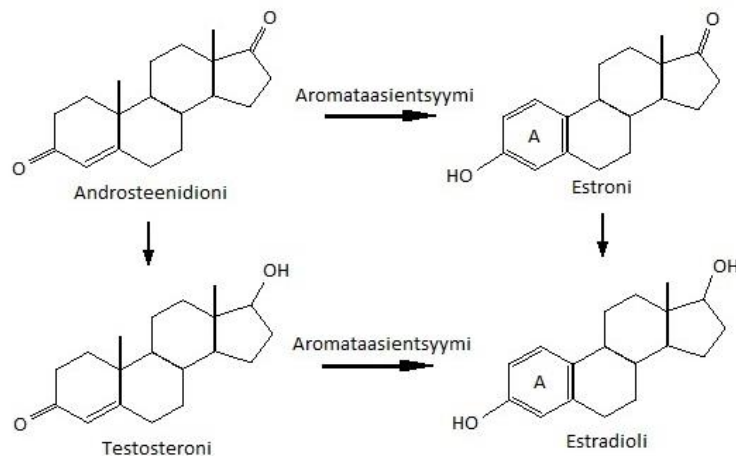
Hoitoina kudoksille ja soluille käytetään 250 nM deksametasonia, joka on glukokortikoidi sekä 5 ng/ml TNF $\alpha$ :a. Hoidetuista näytteistä saatuja tuloksia verrataan vastaaviin kuljetinaltistettuihin näytteisiin. Kuljetin valmistetaan etanoliliuoksesta samoin, kuten deksametasoniliuos.



## 2 OPINTÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT

### 2.1 Aromataasi

Aromataasi eli aromataasi sytokromi P450 on olennainen entsyymi estrogeenin biosynteesissä (Zhao ym. 2009). Aromataasientsyymi on solukalvosidonnainen ja se sijaitsee estrogeeniä tuottavien solujen solulimakalvostossa munasarjoissa, istukassa, kiveksissä, ihossa sekä rasva- että aivokudoksissa (Lääketieteen termit 2014). Aromataasientsyymi toimii katalysoimalla steroidihormonien A-renkaan muuttumista aromaattiseksi. Se muuttaa androsteenidionia ja testosteronia (androgeenejä) estroniksi ja estradioliksi (estrogeenejä). Toisin sanoen aromataasientsyymi vastaa estrogeenibiosynteesin vaiheesta, jossa testosteroni muutetaan estradioliksi ja androsteenidioni estroniksi. (Lääketieteen termit 2014; Termien määritelmät 2014, Zhao ym. 2009.) Sukupuolirauhasten ulkopuolinen (ekstragonadaalinen) aromataasin ilmentyminen on isossa roolissa estrogeenin tuotannossa, erityisesti lihavilla miehillä ja postmenopausaalisilla naisilla, joilla munasarjojen aromataasiaktiivisuus ja estrogeenin tuotanto lakkaa menopaussin jälkeen (Zhao ym. 2009). Rasvakudoksessa aromataasi ilmentyy pääasiallisesti mesenkymaalisissa stroomasoluissa ja preadiposyyteissä (rasvasolun esimuoto). Aromataasiekspressiota esiintyy myös muissa mesenkymaalisissa soluissa, muuan muassa luuytimen mesenkymaalisissa soluissa. (Lääketieteen termit 2014, Simpson ym. 2002.)



Kuvio 1. Aromataasin toiminta. Muokattu lähteen (Brodie 2002) kuvasta.

## 2.2 CYP19A1-geeni

Ihmisen CYP19A1-geeni säätelee aromataasientsyymin tuotantoa eri kudoksissa. Tällä hetkellä ihmiseltä tunnetaan yksitoista CYP19A1-geenin ilmentymistä säätelevää eksoni-1 –aluetta, joilla kudosspesifiset promootorit sijaitsevat (esimerkiksi II-, I.4- ja I.3-promoottorien on osoitettu toimivan muun muassa rasvakudoksessa). Promoottorien säätelyyn voi vaikuttaa erityisesti eri hormoni- ja sytokiinihoitojen avulla. (Strauss ym. 2012.) Aromataasin ilmentymistä rasvakudoksessa säätelee pääasiassa I.4-promoottori, joka on siis rasvakudosspesifinen promoottori. Tätä promoottoria stimuloi muuan muassa TNF $\alpha$  (tuumorinekroositekijä alfa). Tämä faktori toimii saman mesenkymaalisen promoottorin kautta kuin aromataasigeeni ja vaatii siten glukokortikoideja kostimulaattoreikseen. (Santen ym. 2009, Simpson ym. 2002.)

## 2.3 Estrogeenit

Estradioli ja estroni ovat estrogeenejä. Estradioli on naisilla hedelmällisen iän pääasiallinen estrogeeni. Ennen menopaussia 90 % estradiolista on peräisin munasarjoista. Loput 10 % estradiolista ovat peräisin rasvakudoksessa (and-

rosteenidionista) syntyvästä estronista. Jo muutamia vuosia ennen menopaus-  
sia estradiolin pitoisuus kehossa alkaa vähitellen pienentyä. Estradiolin pitoi-  
suus käy lopulta niin pieneksi, että se ei enää pysty kasvattamaan kohdun lima-  
kalvoa, jolloin kuukautiset loppuvat (menopausi). Estroni onkin naisilla meno-  
paussin jälkeen kehon pääasiallinen hormoni. (Tiitinen 2009.) Estroni muodos-  
tuu rasvakudoksessa androsteenidionista ekstraplandulaarisen (rauhasten ul-  
kopuolella tapahtuvan) aromataasin seurauksena. Androsteenidionin aromatisoi-  
tuminen estroniksi tapahtuu rasvakudoksen lisäksi myös muun muassa lihak-  
sissa, fibroblasteissa sekä luuytimessä. Postmenopausaalisten naisten suurin  
estradiolin lähde on estroni, vaikka myös testosteronia (normaali estradiolin  
lähde) tuotetaan kudoksissa. (Nathan & Judd 2007.) Estronin tuotto on lisäänty-  
nyt lihavilla, postmenopausaalisilla naisilla. Estronia muodostuu siis sitä enem-  
män, mitä lihavampi nainen on. Estradiolin biokemiallinen aktiivisuus on estro-  
niin verrattuna korkeampi. Postmenopausissa estronia on kuitenkin noin kolme  
kertaa enemmän kuin estradiolia. (Tiitinen 2009.)

## 2.4 Estrogeeni rintasyövässä

Valtaosa eli noin 70 % rintasyöivistä on estrogeenireseptori- (ja progesteronire-  
septori) – positiivisia (Huovinen 2004). Runsas määrä estrogeeni- ja progeste-  
ronireseptoreita kasvaimessa on yleensä yhteydessä parempaan ennusteeseen  
(Heikkilä 2012). Terveessä rasvakudoksessa estradiolin tuotantoa (aromataasin  
ilmentymistä) säätelee I.4-promoottori eli promoottori kontrolloi estradiolin  
ekstragonadaalista tuotantoa. Tätä promoottoria stimuloi muun muassa rasva-  
kudoksen soluissa paikallisesti tuotettu TNF $\alpha$ . Rintasyöpäkudoksessa aroma-  
taasin ilmentymisen kasvu kolmin-nelinkertaiseksi johtuukin I.4-promoottorin  
vaihtumisesta II-promoottoriin (normaalisti säätelee gonadaalisten alueiden est-  
radiolin tuotantoa). Rintasyöpää esiintyy yleisimmin rintakudoksessa, jossa est-  
rogeenin määrä on suurempi. Korkeamman estrogeeni tason vuoksi alueet ovat  
otollisempia rintasyövän kasvulle ja kehitykselle. (Santen ym. 2009, Simpson  
ym. 2002.) Rintasyöpäriskin oletetaan olevan suoraan riippuvainen siitä, kauan-  
ko rintarauhanen on ollut alttiina estrogeenin vaikutukselle (Heikkilä 2012). Toi-

sin sanoen varhainen kuukautisten alkamisikä ja myöhään alkaneet vaihdevuodet lisäävät riskiä sairastua rintasyöpään (Huovinen 2014).

## 2.5 hARO-Luc-hiirimalli

hARO-Luc hiirimalli (human aromatase-lusiferase mouse) on transgeeninen hiirimalli, jossa ihmisen koko CYP19A1-geenin säätelyalue on yhdistettynä lusiferaasin reportterigeeniin. hARO-Luc-hiirimallissa CYP19A1-geenin säätelyalueen sisältävään BAC-klooniiin (bacterial artificial chromosome) yhdistettiin lusiferaasin reportterigeeni (tulikärpäsistä), joka sitten mikroinjektoitiin hiiren oosyytteihin (munasolun emosolu). Syntyvien poikasten transgeenisuus tarkistetaan PCR:n avulla. Transgeenisten hiirten kudosten lusiferaasiaktiivisuus jäljittelee ihmisen CYP19A1-geenin ilmentymisprofiilia. Tämä tarkoittaa siis sitä, että aromataasientsyymin tilalla tuotetaankin lusiferaasia ja lusiferaasiaktiivisuutta mittaamalla määritetään CYP19A1-geenin ilmentymistä. (Strauss ym. 2012.) Transgeenisten hARO-Luc – hiirten lusiferaasiaktiivisuus mitataan kaupallisella kitillä käyttäen Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter -levynlukijaa, jolla mitataan hiiristä kerätyistä rasvakudoksista sekä mesenkymaalisista stroomasoluista niiden tuottamaa luminesenssia. (Lääketieteelliset termit 2014, PerkinElmer 2014, Strauss ym. 2012).

Strauss ym. (2012) kehittivät transgeenisen hiirimallin, jossa ihmisen CYP19A1-geeni (ihmisen aromataasigeeni) on yhdistettynä lusiferaasin reportteri – geeniin. Hiiriin geeni saatiin käyttämällä tulikärpäsen lusiferaasia sisältävää BAC-kloonaa, joka mikroinjektoitiin hedelmöityneeseen hiiren varhaismunasoluun (ovosyyttiin). Transgeeniset hiiret erotettiin ei-transgeenisistä syntyneistä poikasista otetuista häntä- ja korvabiopsioista eristetyistä DNA:sta. Hiiren kudosten lusiferaasiaktiivisuus jäljittelee ihmisen CYP19A1-geenin ilmentymistä eli lusiferaasiaktiivisuus ilmaisee aromataasigeenin ilmentymistä. Hiirimallin koirashiihillä lusiferaasiaktiivisuus on korkeampi virtsarakossa ja rakkularauhasissa kuin kiveksissä. Vastaavasti CYP19A1-geenin ja P450arom-proteiinin ilmentyminen havaittiin ihmisen vastaavissa kudoksissa. Tällä kyseisellä kehitetyllä reportteri-

hiirimallilla voidaan siis toteuttaa tutkimuksia ihmisen CYP19A1-geenin kudosspesifiseen säätelyyn liittyen.

### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön ensisijaisena tarkoituksena oli optimoida inkubaatioaika, jota transgeenisistä hARO-Luc–hiiristä kerättyjen rasvakudosten hoitojen vaikuttamiseen käytetään. Tarkoituksena oli siis testata onko tällä hetkellä käytetty 24 tunnin inkubaatioaika optimaalinen deksametasoni- ja TNF $\alpha$ -hoitojen vaikuttamiseen vai saadaanko kudoksista vaste pidemmän ajan hoidoissa. Tämä määritetään siis mittaamalla kudosten lusiferaasiaktiivisuutta. Tarkoituksena oli myös määrittää, kuinka kauan kudosta voi kaiken kaikkiaan viljellä ilman, että aromataasigeenin ilmentyvyyden mitattavuus kärsii.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää optimaalinen hoitojen vaikuttamiseen käytetty inkubaatioaika myös kyseisten transgeenisten hARO-Luc–hiirien reisi- ja sääriluista (*engl.* femur, tibia) kerätyillä mesenkymaalisilla stroomasoluilla. Myös mesenkymaalisista soluista mitattiin aromataasigeenin ilmentymisen mitattavuutta stimulaation jälkeen.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tarkentaa menetelmää sekä mahdollisesti helpottaa rasvakudoksen sekä mesenkymaalisten solujen viljelyvaihetta. Tarkemman optimaalisen inkubaatioajan määrittäminen mahdollisti tarkempien tietojen saamisen hoitojen vaikuttavuudesta rasvakudokseen ja mesenkymaalsiin soluihin. Tavoitteena oli myös määrittää rasvakudoksen sekä mesenkymaalisten solujen kestävyys hoidoissa, jos niitä ei kerätäkään 24 tunnin inkubaatioajan jälkeen. Tavoitteena oli määrittää, voiko inkubaatioajan pidentäminen mahdollisesti tehostaa hoitojen vaikutusta ja siten parantaa tuloksien tarkkuutta. Vaikka inkubaatioajan pidentäminen ei vaikuttaisi tuloksiin, rasvakudoksen ja mesenkymaalisten solujen säilyminen yli vuorokauden helpottaisi näytteiden viljelyä lisäämällä menetelmän joustavuutta.

Opinnäytetyön tehtäviä olivat maitorauhasten- ja gonadaalisten alueiden rasvakudoksen sekä reisi- ja sääriluiden luuytimeistä mesenkymaalisten stroomasolu-

jen kerääminen hARO-Luc-hiiriltä, niiden viljely ja kudoksien ja solujen altistaminen 250 nM deksametasoni- ja 5 ng/ml TNF $\alpha$ -hoidoille sekä lusiferaasiaktiivisuuden mittaaminen 24:n, 48:n, 72 tunnin sekä 7 päivän jälkeen hoidoille altistamisesta. Rasvakudoksista analysoidaan lusiferaasiaktiivisuutta kaupallista Luciferase Assay Kit (BioThema) –määritysmenetelmää käyttäen ja lusiferaasiaktiivisuus suhteutetaan aina kyseisen rasvakudospalan painoon. Mesenkymaalisten solujen lusiferaasiaktiivisuus suhteutetaan kyseisen näytteen proteiinimäärään.

## 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

### 4.1 Opinnäytetyön toteutussuunnitelma

Tälle opinnäytetyölle haettiin toimeksiantosopimus bioanalytiikan koulutusohjelman päälliköltä Leila Tiilikalta keväällä 2014. Tämä opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella Funktionaalisten elintarvikkeiden kehittämiskeskuksessa. Aineistona tässä opinnäytetyössä oli seitsemän yksilön otos siirtogeenisistä koiras ja naaras hARO-Luc-hiiristä. Kokeille oli haettu koe-eläinlupa kansalliselta ELLA-koe-eläinlautakunnalta (lupanumero 7471/04.10.03/2012). Aineiston keruu tapahtui maaliskuis- ja huhtikuun aikana keväällä 2014. Aineiston keruusta ja näytteiden analysoinnista johtuvat kustannukset maksoi opinnäytetyön aiheen antaja eli Funktionaalisten elintarvikkeiden kehityskeskus Professori Sari Mäkelän tutkimusryhmä. Tämän opinnäytetyön ohjaajana toimi dosentti Niina Saarinen-Aaltonen ja ohjaavana opettajana toimi yliopettaja Ilari Suominen Turun ammattikorkeakoulusta.

### 4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivinen tutkimus eli määrällinen tutkimus perustuu aiempien tutkimusten johtopäätöksiin ja teoriaan. Olennaista kvantitatiivisissa tutkimuksissa on, että kerättävä havaintoaineisto soveltuu määrälliseen eli numeeriseen mittaamiseen. Otantasuunnitelmassa määritellään perusjoukko, johon tulosten tulee päteä. Tästä perusjoukosta otetaan otos, jonka avulla määritetään tulokset koko perusjoukolle. Havaintoaineistossa ei käsitellä yksittäisiä tapauksia vaan sitä käsitellään objektiivisesti kokonaisuutena. Kvantitatiivisissa tutkimuksissa havaintoaineisto saatetaan tilastollisesti käsiteltävään muotoon, jotta päätelmät voitaisiin tehdä tilastolliseen analysointiin perustuen. (Hirsijärvi, Remes & Sajavaara 2004.)



Tämä opinnäytetyö on kvantitatiivinen opinnäytetyö, koska tämän opinnäytetyön havaintoainestoa varten oli valittu etukäteen transgeenisiksi määritettyjen hiirten joukosta (perusjoukko) seitsemän hiirtä (otos). Näiden hiirten rasvakudoksesta sekä reisi- ja sääriluiden mesenkymaalisista soluista muodostettiin riittävä aineisto, jonka avulla inkubaatioajat optimoitiin. Rasvakudoksien viljelyvaiheessa eri hiiristä kerätyt näytteet pidettiin toisistaan erillään, jotta aineiston avulla voitaisiin nähdä, esiintyykö hiirien välillä vaihtelua. Eri hiirten mesenkymaaliset solut puolestaan kerättiin yhteen, jotta soluja saatiin tarpeeksi. Yhteen kerätyt solut jaettiin riittävän moneen kuoppaan kuoppalevyille, jotta inkubaatioaika voitiin optimoida. Rinnakkaiset tulokset tilastoitiin Microsoft Excel-ohjelmalla, ja tulokset esitettiin kuvaajien avulla käyttäen GraphPad Prism -ohjelmaa.

#### 4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Tälle opinnäytetyölle on olemassa tarvittavat ja asianmukaiset tutkimusluvut. Eettiset näkökohdat koskivat tässä opinnäytetyössä lähinnä eläinkokeita ja koe-eläinten kohtelua, joten informoivia tutkimushenkilöitä ei ollut. Eläinkokeiden tekeminen on luvanvaraista toimintaa, joten niille on aina haettava lupa valtioneuvoston asettamalta eläinkoelautakunnalta (KEK 2014). Tämän opinnäytetyön hankelupa on nimellä: Estrogeenituotannon säätelyn tutkiminen lusiferaasiraportoijahiirillä, lupanumero 7471/04.10.03/2012.

Hiirten lopettamisen hyväksyttävällä menetelmällä suoritti koe-eläinkurssin käynyt tämän opinnäytetyön ohjaaja. Koska koe-eläinten perimää on muokattu keinoitekoisesti, ovat kyseiset koe-eläimet eläinsuojeluvirannomaisten lisäksi myös geenitekniikkalautakunnan valvonnassa. (KEK 2009.) Geenitekniikka voidaan määritellä esimerkiksi seuraavalla tavalla: tekniikka, joissa organismiin viedään suoraan organismin ulkopuolella valmistettua tai muunnettua perintöainesta, mukaan lukien mikro- ja makroinjektio (Geenitekniikkalaki 377/1995, Valtioneuvoston asetus geenitekniikasta 928/2004). Tämä opinnäytetyö tehtiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä noudattaen eli sitä tehdessä noudatettiin rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta. Työvaiheet kirjattiin laboratoriapäiväkirjaan. (Hyvä

tieteellinen käytäntö 2012.) Alkuperäiset tulokset säilytetään yliopiston ohjeiden mukaisesti vähintään 10 vuotta.

Opinnäytetyön tarkoituksena on nopeuttaa ja tarkentaa menetelmää, jolla lusi-feraaasiaktiivisuutta mitataan hiirten rasvakudoksista sekä mesenkymaalisista soluista. Optimoimalla menetelmää, pystytään tarkentamaan tuloksia ja saamaan menetelmä mahdollisesti toimivammaksi, joka vähentäisi eläinkokeiden tekemistä.

#### 4.4 Maitorauhasten- ja gonadaalisen rasvakudoksen kerääminen

Sekä naaras- että koiras-hARO-Luc –hiiriltä kerättiin talteen rasvakudos samoilta alueilta. Neljän naarashiiren maitorauhasten rasvakudos kerättiin välttämällä imusolmukkeet. Kolmen koirashiiren rasvakudos kerättiin vastaavilta alueilta edelleen välttämällä imusolmukkeita. Gonadaalinen rasvakudos kerättiin talteen hiiriltä sukupuolielimiä ympäröivältä alueelta. Rasvakudos jaettiin suurin piirtein samankokoisiin kudospaloihin, jotka punnittiin yksitellen ja laitettiin sitten 24 kuopan kuoppalevyille ennalta tehtyyn DMEM/F12 – elatusaineeseen, johon oli lisätty penisilliiniä ja streptomysiiniä. Rasvakudospalojen painot ja paikat merkittiin tarkasti ylös. Ennen hoitojen laittamista rasvakudoksien rakennetta hajotettiin kevyesti kirurginveitsellä, jotta hoidot pääsivät vaikuttamaan paremmin. Kudoksia säilytettiin 37 °C –asteen kosteutetussa lämpökaapissa, jossa oli 5 % hiilidioksidia.

#### 4.5 Mesenkymaalisten stroomasolujen kerääminen

Rasvakudoksen keräämisen yhteydessä kaikilta kolmelta koirashiireltä kerättiin myös takajalkojen reisi- ja sääriluut, jotka laitettiin ensin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS). Luista leikattiin yksitellen päät pois ja luuytimen solut huuhdeltiin ennalta tehdyllä luuytimen solujen elatusaineella (Liite 3) ruiskun ja neulan avulla ulos luista. Kaikista luista saadut solut kerättiin yhteen putkeen. Solut sentrifugoitiin ja pelletti suspensoitiin 2 ml samaa  $\alpha$ MEM-elatusainetta

käyttäen. Solujen määrä laskettiin käyttäen Bürkerin kammiolaskentaa ja solut laitettiin 1 miljoona solua/cm<sup>2</sup> T75-soluviljelypulloon 13 ml  $\alpha$ MEM-elatusaineeseen. Solujen elatusaine vaihdettiin kertaalleen ennen solujen jakamista kolmeen T75-soluviljelypulloon (1 ml solususpensiota ja 12 ml  $\alpha$ MEM-elatusainetta). Kudoksia säilytettiin 37 °C –asteen kosteutetussa lämpökaapissa, jossa oli 5 % hiilidioksidia. Solut irrotettiin soluviljelypullojen pohjalta käyttäen trypsiiniä. Irrotetut solut yhdistettiin taas yhteen putkeen, joka sentrifugoitiin ja pelletti suspensoitiin 4 ml  $\alpha$ MEM-elatusainetta. Solujen määrä tarkistettiin taas Bürkerin kammiolaskentaa käyttäen ja varmistettiin, että soluja on tarpeeksi opinnäytetyötä varten. Solut jaettiin 12 kuopan kuoppalevyille 56  $\mu$ l (noin 70000 solua) solususpensiota ja 1,5 ml  $\alpha$ MEM-elatusainetta aina yhteen kuoppaan.

#### 4.6 Käytetyt elatusaineet

Rasvakudosten elatusaineena käytettiin HEPES:iä ja L-glutamiinia (Gibco®) sisältävää DMEM/F-12 – elatusainetta (Life technologies), johon lisättiin Penicillin/Streptomycin - antibioottia (Gibco®). Opinnäytetyössä käytetyt rasvakudosten hoidot laimennettiin tällä elatusaine-antibioottiyhdistelmällä.

Mesenkymaalisten stroomasolujen elatusaineena käytettiin  $\alpha$ MEM-elatusainepohjaista (Gibco®) elatusainetta. Työohjeen mukaan tehty elatusaine sisälsi  $\alpha$ MEM-elatusainetta, HEPES:iä (Gibco®), L-Glutamiinia (Gibco®), Penicillin/Streptomycin - antibioottia (Gibco®), Fungizone® Antimycotic (Gibco®) – antibioottia sekä iFBS:ia (USA, Gibco®). Mesenkymaalisten stroomasolujen viljelyvaiheessa käytettiin elatusainetta, jossa oli mukana myös deksametasonia ( $1 \cdot 10^{-6}$  M). Hoidot laimennettiin  $\alpha$ MEM-elatusaineeseen, josta deksametasoni jätettiin pois.

#### 4.7 Kuljettimen ja hoitojen laimentaminen

Sekä rasvakudoksille että mesenkymaalisille stroomasoluille käytettiin saman vahvuisia hoitoja, jotka laimennettiin yllämainittuihin elatusaineisiin. Deksametasoni-hoidon pitoisuus laimennettiin  $1 \cdot 10^{-2}$  M etanoliliuoksesta elatusaineella 250 nM vahvuiseksi. hR TNF $\alpha$  -hoidon (Sigma T0157) pitoisuus laimennettiin 10 mg/ml vahvuisesta fosforipuskuriliuoksesta elatusaineella 5 ng/ml vahvuiseksi. Kummatkin hoidot laimennettiin siten, että lopullinen pitoisuus laimennettiin yhteen elatusainetta sisältävään putkeen. Putkesta pystyttiin siis pipetoimaan hoidot samaan kuoppaan yhdellä kerralla.

Myös kuljetin laimennettiin rasvakudoksille ja mesenkymaalisille stroomasoluille samalla tavalla etanoliliuoksesta. Kuljettimien elatusaineet sisälsivät siis ainoastaan etanolia ja elatusainetta. Kuljettimien laimennetulla etanolilla korvattiin deksametasoni-liuoksen etanolin määrä hoitojen elatusaineessa, jotta kuljettimien- ja hoitojen elatusaineiden olosuhteet olisivat mahdollisimman samanlaiset.

#### 4.8 Menetelmän optimointi maitorauhasten- ja gonadaalisilla rasvakudoksilla

Maitorauhasten- ja gonadaalisen rasvakudoksien menetelmän optimointi aloitettiin kolmen koirashiiren rasvakudoksilla. Rasvakudoksista haluttiin määrittää kauanko rasvakudokset kestävät pelkässä elatusaineessa säilyttäen herkkyytensä CYP19A1-geeniekspressiota stimuloiville tekijöille. Maitorauhasten- ja gonadaaliset rasvakudokset pidettiin erillään. Jokaisen hiiren kahteen ensimmäisen kudospalan (sekä maitorauhasten- että gonadaalisen rasvakudoksen) kuoppaan lisättiin kuljetin (yhteen) ja 250 nM deksametasoni- ja 5 ng/ml TNF $\alpha$ -hoidot (toiseen) kuoppaan. Lopuissa kudosten kuopissa oli DMEM/F-12 – elatusainetta. Hoitojen annettiin vaikuttaa 24 tuntia 37 °C-asteessa, jonka jälkeen stimuloidut kudokset kerättiin merkittyihin homogenointi-putkiin (sisältävät pieniä keraamisia kuulia) ja pakastettiin -70 °C-asteeseen. Seuraaviin kahteen kudospalaan (jokaiselta hiireltä) vaihdettiin samalla kertaa kuljetin omaan kuoppaan ja

250 nM deksametasoni- ja 5 ng/ml TNF $\alpha$ -hoidot toiseen kuoppaan. Hoitojen annettiin vaikuttaa taas 24 tuntia 37 °C-asteessa, jonka jälkeen ne kerättiin merkittyihin homogenisointi-putkiin ja pakastettiin -70 °C-asteeseen. Sama toistettiin edelleen 72 tuntia ja 7 päivää elatusaineessa olleille kudospaloille.

Naarashiirten mitorauhasten- ja gonadaalisilla rasvakudoksilla testattiin, kuinka lusiferaasiaktiivisuus on mitattavissa rasvakudoksissa CYP19A1-geenin stimulaation aikana. Optimointi aloitettiin laittamalla kuljetin ja 250 nM deksametasoni- ja 5 ng/ml TNF $\alpha$ -hoidot kaikkiin kudospalojen kuoppiin samalla kerralla, siten että kaikille testattaville inkubaatioajalle oli yksi kuljetin- ja yksi hoitojen kuoppa jokaista naarashiirtä kohden (mitorauhasten- ja gonadaaliset rasvakudokset pidettiin erillään). Rasvakudospalat olivat samoissa elatusaineissa koko optimoinnin ajan. Jokaisen hiiren kudospaloista kerättiin yksi kuljetin-elatusaineessa ja yksi hoitojen elatusaineessa ollut kudospala aina 24, 48, 72 tunnin ja 7 päivän inkubaatioajan jälkeen. Kaikki stimuloidut kudospalat kerättiin merkittyihin homogenisointi-putkiin ja säilytettiin -70 °C-asteisessa pakastimessa. Kudokset inkuboituihin 37 °C-asteessa.

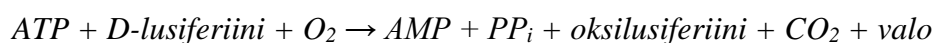
#### 4.9 Menetelmän optimointi mesenkymaalisilla stroomasoluilla

Mesenkymaalisilla stroomasoluilla testattiin, kuinka lusiferaasiaktiivisuus on mitattavissa soluviljelmissä CYP19A1-geenin stimulaation jälkeen. Ennen hoitoille altistamista kuoppalevyiltä tarkistettiin, että solut peittivät vähintään 70 % kuoppien pohjien pinta-alasta. Kuoppiin laitettiin samat 250 nM deksametasoni- ja 5 ng/ml TNF $\alpha$ -hoidot ja kontrollisoluille vastaavasti kuljetin elatusaineessa. Hoitojen annettiin vaikuttaa 24 tuntia 37 °C-asteessa. Vuorokauden jälkeen hoidot ja kuljetin otettiin pois kuopista ja kuoppien solut huuhdeltiin PBS:llä. Ensimmäisistä neljästä kuljetin- ja hoitokuoppaparista kerättiin solut talteen, loppuihin kuoppiin laitettiin  $\alpha$ MEM-elatusaine. Lopuista kuopista kerättiin sama määrä soluja 48 ja 72 tunnin sekä 7 päivän jälkeen. Solut kerättiin kuopista hajottamalla ne (PBS-huuhtelun) jälkeen käyttäen Tropin® soluhajotusliuosta (*engl.* lysis solution), jossa oli mukana 1  $\mu$ l 1M DTT:ä millilitrassa soluhajotus-

liuosta. Kerätyt solut säilytettiin etukäteen merkityissä eppendorf-putkissa -70 °C-asteessa.

#### 4.10 Lusiferaasiaktiivisuuden mittaaminen

Rasvakudokset homogenisoitiin ennen lusiferaasiaktiivisuuden mittaamista ohjeen mukaan tehdyllä soluhajotusliuoksella. Liuos tehtiin jäällä 50 x TAE-puskurista (pH 8.0), 0,5 M EDTA (pH 8.0), glyserolista, Triton-X-100 (ioniton tensidi), tislattua vettä, 1M DTT sekä yksi Rochen proteaasimestäjä –minitabletti 20 ml soluhajotusliuosta kohden. Soluhajotusliuos pipetoitiin homogenointi-putkiin. Rasvakudokset pidettiin jäällä työvaiheiden välissä. Rasvakudosten homogenointi tehtiin MP Homogenisaattorilla. Homogenisoinnin jälkeen rasvakudokset sentrifugoitiin 4 °C-asteessa (3000 rpm) 30 minuuttia. Supernatantti kerättiin uusiin merkittyihin eppendorf-putkiin, jotka pidettiin edelleen jäällä. Supernatantit pipetoitiin 96 kuopan kuoppalevylle (Lumitrac 200) jättäen ensimmäisen rivin kuoppalevystä soluhajotusliuokselle taustojen mittaamista varten. Lusiferaasiaktiivisuus mitattiin näytteistä Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter –laitteella Luciferase Assay Kitiä (BioThema) käyttäen (Liite 1). Luciferase Assay Kitin kaksi substraattia, ATP ja D-lusiferiini, lisättiin ohjeen mukaisesti näytteisiin. Reagenssit sisältävät myös magnesiumioneja, PP<sub>i</sub>:tä, DTT:tä sekä BSA:ta. Näytteissä oleva lusiferaasientsyymi katalysoi reaktiota, jossa ATP muuttuu AMP:ksi seuraavasti:



Kaava 1. Lusiferaasimittauksen reaktioyhtälö.

Reaktiossa syntyi valoa ja tätä havaittua valonmäärää mitattiin luminesenssina Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter –laitteella.

Mesenkymaaliset stroomasolut hajotettiin niiden keräämisen yhteydessä Tro-pix® soluhajotusliuoksella, joten homogenointi-vaihetta ei tehty. Mesenkymaaliset solut pipetoitiin 96 kuopan kuoppalevylle jättäen ensimmäisen rivin kuoppalevystä soluhajotusliuokselle. Mesenkymaalisten solujen lusiferaasiaktiivisuuden

mittaaminen tehtiin samalla Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter –laitteella Luciferase Assay Kitiä (BioThema) käyttäen (Liite 1).

Rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuus suhteutetaan kudospalojen painoihin. Mesenkymaalisten solujen lusiferaasiaktiivisuus suhteutetaan kyseisen näytteen proteiinimäärään. Näytteiden proteiinimäärä määritettiin käyttäen BCA Protein Assay Kitiä (Pierce). Proteiinimäärityksessä (Liite 2) mitataan näytteiden absorbanssia spektrofotometrillä aallonpituudella 562 nm. 96 kuopan kuoppalevyn alkuun pipetoitiin työohjeen mukaan soluhajotusliuoksesta PBS:llä laimennettu standardisuora (kaksi rinnakkaista per pitoisuus). Standardisuoran näytekäivojen perään pipetoitiin mitattavat näytteet (kaksi rinnakkaista per näyte). Näytteet analysoitiin käyttäen edelleen saman Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter –laitteen BCA-analyysia. BCA Protein Assay Kitin reagenssit A ja B sekoitettiin työohjeen mukaisesti 50:1 ja lisättiin standardisuoran- ja näytteiden näytekäivoihin. Periaatteenä on reagenssien kupari-ionien  $\text{Cu}^{2+}$  pelkistyminen  $\text{Cu}^{1+}$ -ioneiksi näytteiden proteiinin toimesta. Pelkistyminen on siis verrannollinen läsnäolevan proteiinin määrään. BCA reagoi pelkistyneiden  $\text{Cu}^{1+}$ -ionien kanssa muodostaen violetin värisen reaktiotuotteen emäksisessä ympäristössä. Reaktion vahvuutta mitataan spektrofotometrillä (aallonpituudella 562 nm). (Thermo Scientific 2014.)

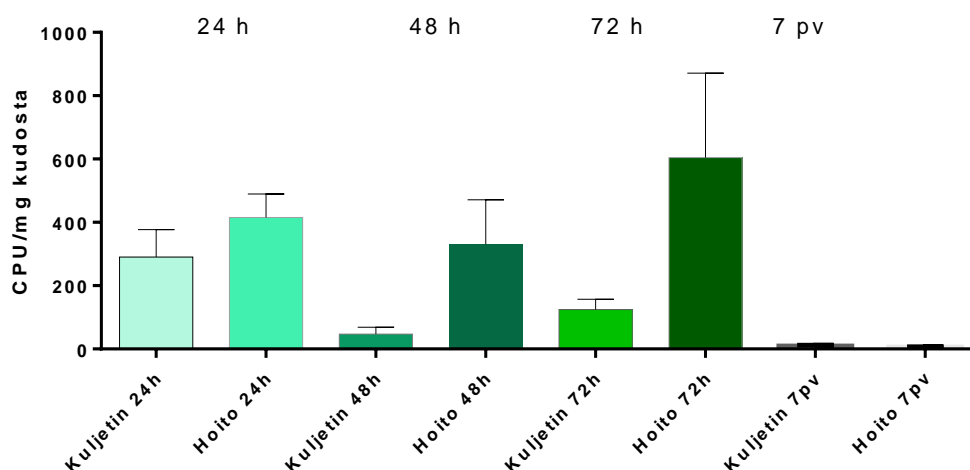
## 5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

### 5.1 Lusiferaasiaktiivisuus maitorauhasten- ja gonadaalisessa rasvakudoksessa koirashiirillä

Maitorauhasten- ja gonadaaliset rasvakudokset pidettiin erillään. Naaras- ja koirashiirten kudoksien lusiferaasiaktiivisuus testattiin erikseen. Kuljettimien ja hoitojen välistä eroa tutkimalla saadaan selville paljonko itse 250 nM deksametasoni ja 5 ng/ml TNF $\alpha$  -hoidot ovat vaikuttaneet rasvakudoksiin, eikä vain inkubaatio-olosuhteet (esim. deksametasonissa oleva etanoli). Jokaisen inkubaatioajan kuljettimen ja hoitojen välillä on oltava selkeä ero ja CPU:n on oltava sekä kuljettimissa että hoidoissa selkeästi yli nollan (0 CPU/mg).

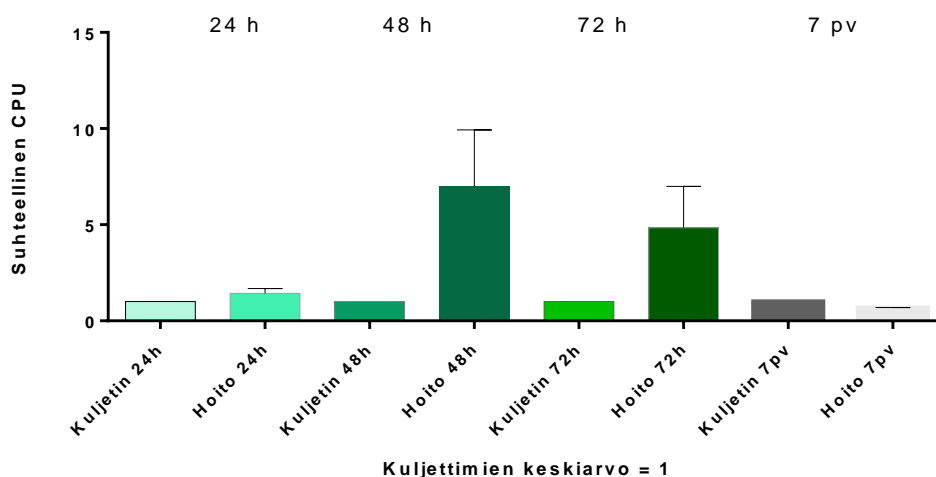
Koirashiirten maitorauhasten rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuus (Kuvio 2.) säilyy rasvakudoksissa kolmen ensimmäisen vuorokauden ajan pelkässä elatusaineessa (kuljetin ja hoidot uusittiin aina vuorokaudeksi kyseisiin rasvakudoksiin). 48 tunnin inkubaation ( $p < 0,05$ ) ja 72 tunnin inkubaation ( $p < 0,05$ ) kuljettimien ja hoitojen välinen ero oli jokseenkin merkitsevä. 24 tunnin inkubaatiossa kuljettimen vaste hoitoihin verrattuna on liian korkea, joten ero ei ole merkitsevä ( $p > 0,1$ ). Seitsemän päivän jälkeen maitorauhasten rasvakudoksista ei enää saada tarpeeksi suurta vastetta.





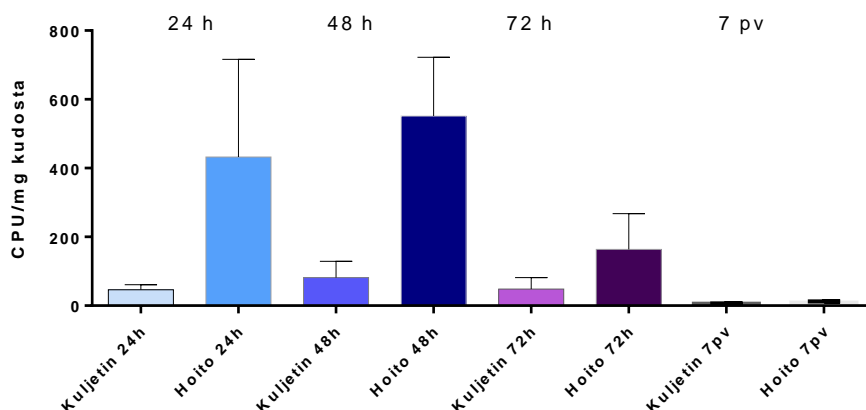
Kuvio 2. Koirashiirten maitorauhasen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg) ja keskihajonnan virhepalkit. Hoidot uusittiin kudostiljelmiin aina 24 tunnin välein.

Kuljettimen lusiferaasiaktiivisuuteen suhteutettujen arvojen (Kuvio 3) avulla näkee paremmin kuljettimien ja hoitojen väliset erot. 24 tunnin inkubaatioajan kuljettimen lusiferaasiaktiivisuus (suhteellinen CPU) on normaalia korkeampi, mutta on silti matalampi kuin saman inkubaatioajan hoitojen CPU. 24 tunnin inkubaation jälkeen kuljettimen ja hoitojen lusiferaasiaktiivisuudet ovat kuitenkin yli 200 CPU/mg, vaikka ero ei olekaan merkittävä ( $p > 0,1$ ). Seitsemän päivän inkubaation jälkeen tulokset näyttävät korkeammilta suhteutetuissa arvoissa (Kuvio 3), mutta niiden alkuperäiset mitatut aktiivisuusarvot ovat erittäin matalat (Kuvio 2).



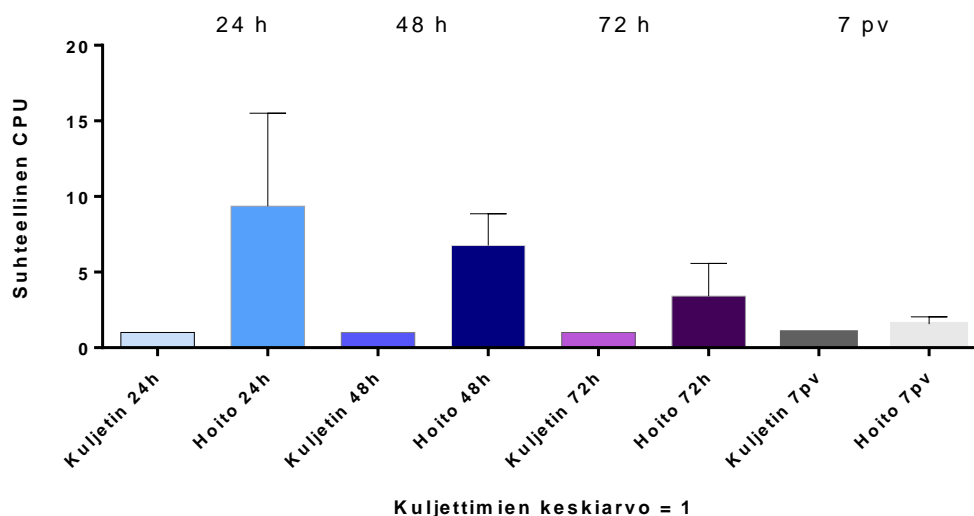
Kuvio 3. Koirashiirten maitorauhasen rasvakudoksen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.

Koirashiirten gonadaalisen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus (Kuvio 4.) säilyy kudoksissa maitorauhasen rasvakudoksen tavoin kolme vuorokautta pelkässä elatusaineessa (kuljetin ja hoidot laitettiin aina vuorokaudeksi kyseisiin rasvakudoksiin). Seitsemän päivän jälkeen gonadaalisesta rasvakudoksesta ei enää saatu tarpeeksi suurta vastetta. Gonadaalisen rasvakudoksen 24 tunnin inkubaatioajan rasvakudospaloista onnistuttiin saamaan hoidoilla korkeampi ja selkeämpi lusiferaasiaktiivisuuden nousu kuin maitorauhasen vastaavista rasvakudospaloista. Koiraiden gonadaalisesta rasvakudoksesta ainoastaan 24 tunnin inkubaation jälkeen saatiin kuljettimien ja hoitojen välille tilastollisesti merkitsevä ero ( $p < 0,01$ ). 48 tunnin ( $p > 0,1$ ) ja 72 tunnin ( $p > 0,1$ ) inkubaatioiden jälkeen lusiferaasiaktiivisuutta onnistuttiin stimuloimaan, mutta tilastollisesti erot kuljettimien ja hoitojen välillä eivät olleet merkitseviä.



Kuvio 4. Koirashiirten gonadaalisen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg) ja keskihajonnan virhepalkit. Hoidot uusittiin kudosviljelmiin aina 24 tunnin välein.

Koirashiirten gonadaalisen rasvakudoksen suhteutettujen lusiferaasiaktiivisuusarvojen (Kuvio 5.) avulla nähdään tarkemmin lusiferaasiaktiivisuuden lasku, mitä pidemmälle inkubaatioajoissa mennään. Voimakkaimmat vasteet saatiin siis 24 tunnin inkubaatioajan rasvakudoksista. Gonadaalisessa rasvakudoksessa, maitorauhasten rasvakudosten tavoin, seitsemän päivän inkubaatioajan tulokset vaikuttavat korkeammilta suhteutetuissa arvoissa, mutta niiden alkuperäiset arvot (Kuvio 4.) ovat erittäin matalat.



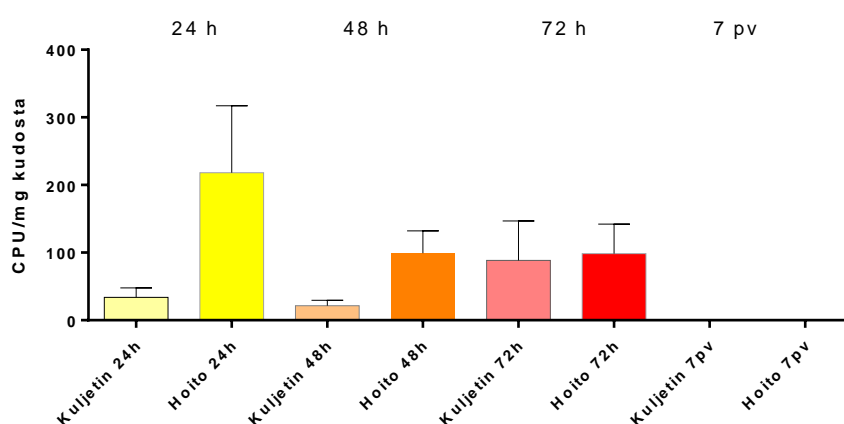
Kuvio 5. Koirashiirten gonadaalisen rasvakudoksen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.

## 5.2 Lusiferaasiaktiivisuus maitorauhasten rasvakudoksessa naarashiirillä

Naarashiirten rasvakudoksista testattiin rasvakudospalojen säilyvyyttä elatusaineessa, joka sisältää kuljettimen tai hoidot. Myös naarashiirillä hoidot laitettiin sekä maitorauhasten- että gonadaalisiin rasvakudoksiin. Lusiferaasiaktiivisuutta mitattaessa huomattiin, että naarashiirten gonadaalisen rasvakudoksen kudospaloista ei saatu mitattua lusiferaasiaktiivisuutta edes analyysin uusimisen jälkeen. Rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuutta naarashiirillä tarkastellaan siksi vain maitorauhasten rasvakudoksista. Lusiferaasiaktiivisuuden mittaamisen yhteydessä todettiin myös, että yksi naarashiiristä ei ollutkaan transgeeninen eli hiirestä kerätyissä näytteissä ei ollut lusiferaasiaktiivisuutta. Kyseisen hiiren tulokset poistettiin kuvioista.

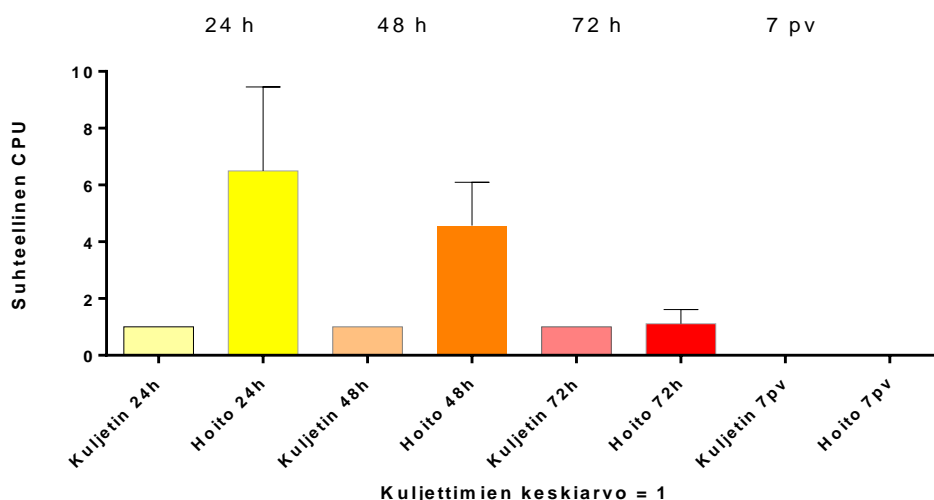
Naarashiirten maitorauhasten rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuus hoito- ja kuljetinelatusaineissa eri inkubaatioajoilla (Kuvio 6.) on havaittavissa kolmen vuorokauden inkubaation jälkeen. Ainoastaan 24 tunnin inkubaation ( $p < 0,05$ ) jälkeen kuljettimen ja hoitojen välinen ero on tilastollisesti merkitsevä. 48 tunnin ja 72 tunnin inkubaatioiden jälkeen lusiferaasiaktiivisuutta onnistuttiin stimuloi-

maan, mutta kuljettimien ja hoitojen välinen ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ( $p > 0,1$ ). Seitsemän päivän jälkeen lusiferaasiaktiivisuus on tippunut kokonaan alas. Alkuperäiset Excel-ohjelmalla käsitellyt tulokset olivat negatiivisia (kudoksesta saatu lusiferaasiaktiivisuus oli matalampi kuin mittauksen yhteydessä määritetty taustan valon emissio), joten kuvioon ne on syötetty nollana (0 CPU/mg). 72 tunnin inkubaatioajan kuljettimen ja hoitojen välinen ero on pieni ja yksittäisen hiiren rasvakudosten kohdalla kuljettimen arvo on korkeampi kuin hoidon.



Kuvio 6. Naarashiirten maitorauhasten rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg) ja keskihajonnan virhepalakit. Rasvakudokset olivat samassa elatusaineessa optimoinnin ajan.

Naarashiirten gonadaalisen rasvakudoksen suhteutettujen lusiferaasiaktiivisuusarvojen (Kuvio 7.) avulla nähdään, että lusiferaasiaktiivisuus laskee sitä enemmän, mitä pidempi inkubaatioaika on. Selkeimmin lusiferaasiaktiivisuuden stimuloitavuus on nähtävissä 24:n ja 48 tunnin inkubaatioajoissa. 72 tunnin inkubaation jälkeinen lusiferaasiaktiivisuuden nousu ei ole tarpeeksi selkeä. Seitsemän päivän inkubaatioajan jälkeiset tulokset on syötetty kuvioon (Kuvio 7.) nollana (0 CPU/mg).

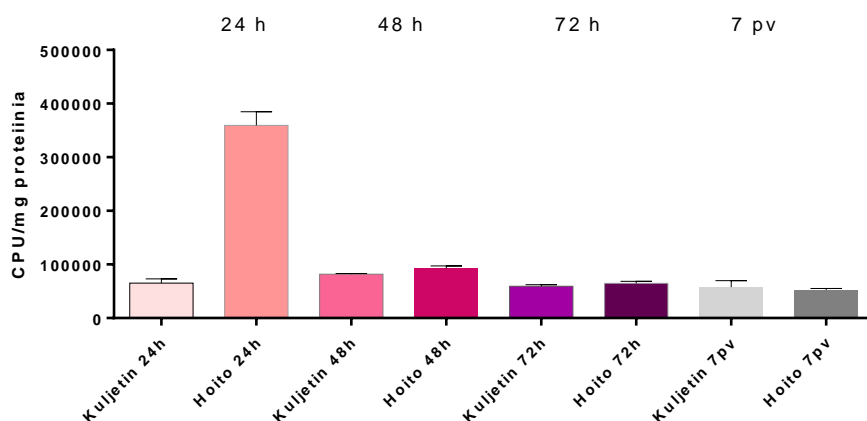


Kuvio 7. Naarashiirten maitorauhasen rasvakudoksen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.

### 5.3 Lusiferaasiaktiivisuus mesenkymaalisissa stroomasoluissa koirashiirillä

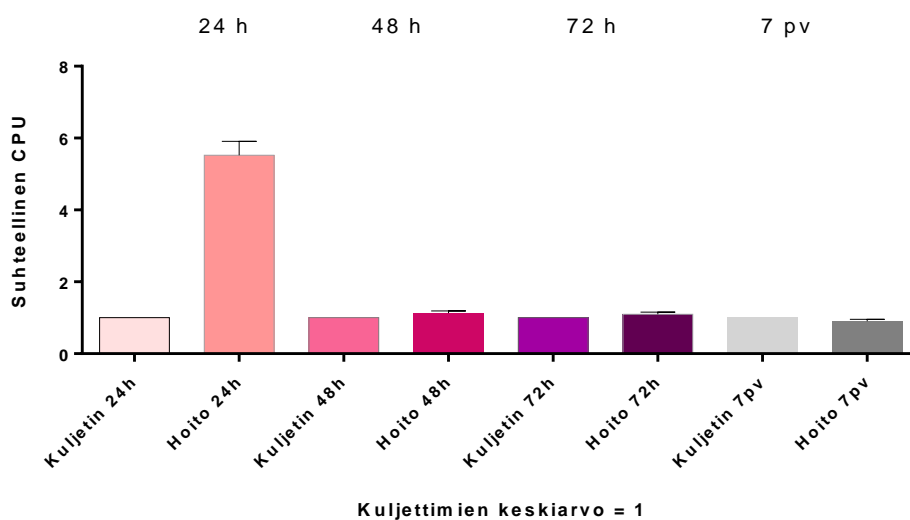
Mesenkymaaliset stroomasolut laitettiin kaikki hoitoihin ensimmäisen 24 tunnin ajaksi. Tuloksista nähdään pysyykö lusiferaasiaktiivisuus samalla tasolla eri inkubaatioaikojen jälkeen. Mesenkymaalisista stroomasoluista saadut lusiferaasiaktiivisuudet ovat huomattavasti korkeampia kuin rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuudet. Mesenkymaalisten stroomasolujen suhteutettujen lusiferaasiaktiivisuuksien avulla voidaan vertailla tuloksia myös rasvakudosten vastaaviin tuloksiin.

Mesenkymaalisista stroomasoluista saatiin vaste kaikilta eri inkubaatioajoilta (Kuvio 8). Tosin ainoastaan 24 tunnin inkubaatioajan kuljettimen ja hoitojen välinen ero ( $p < 0,001$ ) on tilastollisesti merkitsevä. 48 tunnin ( $p < 0,1$ ) ja 72 tunnin ( $p > 0,1$ ) sekä 7 päivän inkubaation jälkeiset hoitojen lusiferaasiaktiivisuusarvot eivät siis eroa kuljettimien lusiferaasiaktiivisuusarvoista merkittävästi. Lusiferaasiaktiivisuus ei laske vähitellen 24 tunnin inkubaation jälkeen, kuten rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuus (Kuvio 5 & 7), vaan laskee nopeasti jo 48 tunnin inkubaation jälkeen.



Kuvio 8. Mesenkymaalisten stroomasolujen lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimien- ja hoitojen arvojen keskiarvot (CPU/mg proteiinia) ja keskihajonnan virhepalkit. Soluviljelmät olivat ensimmäiset 24 tuntia hoidoissa.

Mesenkymaalisten stroomasolujen suhteutetun lusiferaasiaktiivisuuden (Kuvio 9) avulla nähdään edelleen, että ainoastaan 24 tunnin inkubaatioajan hoitojen vaste on tarpeeksi korkea kuljettimeen nähden. Muiden inkubaatioaikojen hoitojen lusiferaasiaktiivisuudet eivät eroa merkittävästi suhteutetusta kuljettimen arvosta.



Kuvio 9. Mesenkymaalisten stroomasolujen kuljetinkontrolliin suhteutettu lusiferaasiaktiivisuus. Kuljettimen keskiarvo on asetettu arvoon 1. Hoitojen suhteutetut arvot on jaettu kyseisen inkubaatioajan kuljettimien keskiarvolla.

#### 5.4 Tulosten tarkastelu

Maitorauhasten- ja gonadaalisen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuus säilyi kudoksissa ensimmäisen kolmen vuorokauden ajan sekä pelkässä elatusaineessa (hoidot laitettiin 24 tuntia ennen kudospalojen keräystä elatusaineesta) että kuljettimissa ja hoidoissa. Vahvimmillaan lusiferaasiaktiivisuus mitattiin 24 tunnin inkubaation jälkeen. Myös 48 tunnin ja 72 tunnin inkubaation jälkeen lusiferaasiaktiivisuutta pystyttiin stimuloimaan, tosin 72 tunnin inkubaation jälkeen rasvakudosten vaste säilyi pelkässä elatusaineessa korkeana. Lusiferaasiaktiivisuuksien tasot vaihtelivat kuitenkin runsaasti. 48 tunnin ja 72 tunnin inkubaation jälkeisistä tuloksista ei siis saatu toistuvasti tilastollisesti merkitseviä eroja.

Maitorauhasten- ja gonadaalisen rasvakudoksen pitäminen hoidoissa pidemmän aikaa kuin 24 tuntia ei nosta rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuuden vastetta. Optimaalinen inkubaatioaika hoidoille on siis 24 tuntia. Koiraiden maitorauhasten rasvakudoksien 24 tunnin inkubaation jälkeinen kuljettimen ja hoitojen välinen ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä, mutta tämän poikkeaman voi olettaa johtuvan kudosten valmisteluvaiheessa tapahtuneesta virheestä. Kaikista muista 24 tunnin inkubaation jälkeisistä tuloksista saatiin toistuvasti parhaimmat erot kuljettimien ja hoitojen välillä verrattuna muihin inkubaatioaikoihin.

Mesenkymaalisten stroomasolujen lusiferaasiaktiivisuutta saatiin stimuloitua eri inkubaatioajoilla, mutta ainoa selkeä ja tilastollisesti merkitsevä vaste saatiin 24 tunnin inkubaation jälkeen. Muiden inkubaatioaikojen lusiferaasiaktiivisuudet eivät nousseet tarpeeksi verrattuna kuljettimien lusiferaasiaktiivisuuksiin. Mesenkymaalisten stroomasolujen optimaalinen inkubaatioaika on siis 24 tuntia hoidossa. Mesenkymaalisten solujen jättäminen hoitoihin pidemmäksi aikaa ei nosta solujen vastetta. Mesenkymaalisten solujen lusiferaasiaktiivisuuden vaste ei myöskään laske vähitellen alas, kuten rasvakudosten lusiferaasiaktiivisuus, vaan tippuu 24 tunnin jälkeisissä inkubaatioajoissa suoraan liian matalaksi. Mesenkymaalisten stroomasolujen hoitojen inkubaatioon ei voida käyttää muuta kuin 24 tuntia.



## 6 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tehtäviä olivat maitorauhasten- ja gonadaalisen rasvakudoksen sekä mesenkymaalisten stroomasolujen kerääminen hARO-Luc-hiiriltä sekä käytettyjen 250 nM deksametasoni- ja 5 ng/ml TNF $\alpha$ -hoitojen optimaalisen inkubaatioajan määrittäminen näille kudoksille. Tämä tutkimustehtävä suoritettiin keväällä 2014.

Rasvakudosten ja mesenkymaalisten stroomasolujen optimaaliseksi inkubaatioajaksi määritettiin tässä opinnäytetyössä 24 tunnin inkubaatioaika. Kyseinen inkubaatioaika vastasi oletettua, jo aikaisemmin menetelmässä käytettyä, inkubaatioaikaa. Lusiferaasiaktiivisuus ei nouse, vaikka rasvakudoksia pidettäisiin hoidoissa pidemmän aikaa. Menetelmää optimoimalla saatiin myös selville, että mesenkymaaliset stroomasolut säilyttävät lusiferaasiaktiivisuutensa vain ensimmäisen 24 tunnin ajan.

Kaiken kaikkiaan tämän opinnäytetyön aineisto saatiin kuudesta hARO-Luc –hiirestä. Määrä ei ole suuri, mutta saadut tulokset olivat toistuvia ja niitä vertailemalla toisiinsa pystyttiin tekemään johtopäätökset luotettavista inkubaatioajoista. Aineistoa käsitellessä Excel-ohjelmalla huomattiin, että rasvakudosten signaalitasot (CPU:t) vaihtelivat paljon eri kudospalojen välillä. Lusiferaasiaktiivisuustason vaihtelu on luultavasti selitettävissä eläinkohtaisilla eroilla. CPU:den vaihteluun eri kudospalojen välillä on voinut vaikuttaa myös rasvakudoksen rakenteen kevyt hajottaminen kirurginveitsellä. Veitsenterä tylsistyi nopeasti muutaman rasvakudospalan käsittelyn jälkeen, mikä hankaloitti kudospalojen tasaista käsittelyä.

Naarashiirten gonadaalinen rasvakudos jätettiin pois tuloksista, koska niistä ei onnistuttu saamaan vastetta lusiferaasiaktiivisuutta mitattaessa. Lusiferaasiaktiivisuuden mittaaminen uusittiin kertaalleen ja tulos oli sama, joten käsittelyssä tapahtui virhe, mitä luultavimmin kuljettimien ja hoitojen laimentamisessa. Hiiriä oli varattu tämän opinnäytetyön tekemiseen rajattu määrä, joten gonadaalisen rasvakudoksen lusiferaasiaktiivisuutta naarashiirillä ei pystytty uusimaan. Tämän

opinnäytetyön menetelmät toteutettiin ohjeiden mukaisesti, joten ne pystytään kaikki uusimaan tarpeen mukaan.

Tämän opinnäytetyön aihe oli opinnäytetyön tekijälle vieras ja lähdemateriaali oli pääosin englanninkielinen, mikä loi haasteita tämän opinnäytetyön teoriaosuuden kirjoittamisessa. Myös tässä opinnäytetyössä käytetyt menetelmät olivat opinnäytetyön tekijälle uusia. Teoriaosuus ja tutkimustulokset on käyty läpi tämän opinnäytetyön ohjaajan Niina Saarinen-Aaltosen kanssa asiavirheiden välttämiseksi sekä tulosten luotettavuuden turvaamiseksi.

## LÄHTEET

- Brodie A 2002. Aromatase inhibitors in breast cancer. Trends in Endocrinology & Metabolism 13(2):61-65. Viitattu 18.11.2014. <http://www.cell.com/cms/attachment/558622/4013519/gr1.jpg>  
 Geenitekniikkalaki 377/1995
- Heikkilä P, 2012. Rinta. Patologia, toim. Mäkinen M, Carpén O, Kosma V, Lehto V, Paavonen T & Stenbäck F. Duodecim, 2012: 879, 882.
- Heino J & Vuento M 2009. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: WSOY pro Oy, ss. 302-304.
- Hirsijärvi S, Remes P & Sajavaara P, 2004. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Tammi.
- Huovinen R, 2004. Levinneen rintasyövän hormonihoito. Suomen Lääkärilehti 2004, 59:1773.
- Huovinen R, 2014. Rintasyöpä. Lääkärin käsikirja, Duodecim. Viitattu 24.11.2014. [http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p\\_artikkeli=ykt00620&p\\_haku=rintasy%C3%B6p%C3%A4](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00620&p_haku=rintasy%C3%B6p%C3%A4)
- Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. 2012. Tutkimus-eettinen neuvottelukunta. Viitattu 8.5.2014. [http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/htk\\_ohje\\_verkko14112012.pdf](http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/htk_ohje_verkko14112012.pdf)
- Koe-eläin keskus, KEK 2009. Turun yliopisto. Viitattu 4.5.2014. [www.animalcenter.utu.fi](http://www.animalcenter.utu.fi)
- Koe-eläin keskus, KEK 2014. Turun yliopisto. Viitattu 4.5.2014. [www.animalcenter.utu.fi](http://www.animalcenter.utu.fi)
- Lääketieteen termit 2014. Duodecim. [http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/terveysportti/rex\\_terminologia.koti](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/terveysportti/rex_terminologia.koti)
- Nathan L & Judd H 2007. Menopause & Postmenopause. Current diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology, 10. painos. The McGraw-Hill Companies 2007: 957-958.
- PerkinElmer 2014. VICTOR2 Multilabel Counter, with IR, High DensityTR-fluorometry, Stacker and Robot Loading. Viitattu 4.5.2014. <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/1420-018>
- Santen R, Brodie H, Simpson E, Siiteri P & Brodie A 2009. History of Aromatase: Saga of an Important Biological Mediator and Therapeutic Target. Endocrine Reviews, 2009, 30(4):343–375.
- Simpson E, Clyne C, Rubin G, Boon W, Robertson K, Britt K, Speed C, and Jones M 2002. Annu. Aromatase – a brief overview. bac Rev. Physiol. 64:93–127.
- Strauss L, Rantakari P, Sjögren K, Salminen A, Lauren E, Kallio J, Damdimopoulou P, Boström M, Boström PJ, Pakarinen P, Zhang F, Kujala P, Ohlsson C, Mäkelä S, Poutanen M 2012. Seminal vesicles and urinary bladder as sites of aromatization of androgens in men, evidenced by a CYP19A1-driven luciferase reporter mouse and human tissue specimens. FASEB Journal 27(4):1342-1350.
- Termien määritelmät 2014, Kansainväliset MeSH-termit. Duodecim. [http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/terveysportti/rex\\_terminologia.koti](http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/terveysportti/rex_terminologia.koti)
- Thermo Scientific 2014. BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid). Viitattu 25.11.2014. <http://www.piercenet.com/product/bca-protein-assay>
- Tiitinen A, 2009. Gynekologinen endokrinologia. Endokrinologia, toim. Välimäki M, Sane T, Leo Dunkel. Duodecim, 2009: 702-703.
- Valtioneuvoston asetus geenitekniikasta 928/2004
- Zhao H, Innes J, Brooks DC, Reierstad S, Yilmaz MB, Lin Z, Bulun SE 2009. A novel promoter controls Cyp19a1 gene expression in mouse adipose tissue. Reproductive Biology and Endocrinology. 7(37). <http://www.rbej.com/content/pdf/1477-7827-7-37.pdf>

28.08.2012

## Luciferase activity measurement from tissues

### Tissue preparation:

Prepare lysis buffer (100 ml) when needed:

- 1.25 ml 50x TAE pH 8.0
  - 200 µl 0,5 M EDTA pH 8.0
  - 11,36 ml glycerol (88-86%)\*
  - 1 ml Triton-X-100
- ⇒ add dist. water up to 100 ml (86,19 ml).

**\*Note, when glycerol ≥99% is used add 10 ml.**

→ This basic mix can be stored at +4°C.

Just before use add following components into each 20 ml of lysis buffer:

- 40 µl 1M DTT (DL-Dithiothreitol, prepared in PBS, aliquoted, and stored at -20°C)
  - 1 complete minitab (Roche)
- dissolve on ice (takes some time)

### Tissue homogenization

Prepare coded plastic tubes for each sample to be homogenized, i.e. one ~13 ml round bottom disposable plastic tube for homogenization and 2 x eppendorf tubes for each homogenate (one tube for collection of homogenate for centrifugation, and one tube for supernatant). Ice and dry ice are needed for sample storage during homogenization.

Store tissue samples on dry ice. Transfer frozen tissue sample into ~13 ml tube, add lysis buffer at appropriate volume (usually 400-1000 µl/ sample) and homogenize with Ultra-turrax (22000-24000 1/min). Wash blade between samples with 3 x dist. water followed with 1 x lysis buffer. Change wash solutions when needed. Store homogenates on ice. Centrifuge samples at +4°C 3000rpm with eppendorf centrifuge (fits 24 samples at the time) for 30 min. If needed, centrifugation can be repeated to obtain more supernatant (typically needed for e.g. brain tissue). Collect supernatant to new clearly coded eppendorf tubes. Measure luciferase activity immediately or store samples at -80°C max. 7 days prior to activity measurements.

**Note: Save some lysis buffer for background measurements in CPU analysis and for preparation of standards in protein analysis.**

### Luciferase activity measurement with Luciferase assay kit (BioThema)

1. Take one vial of D-luciferin (yellow cap) and one vial of ATP (blue cap) and reconstitution buffer to room temperature one hour before measurement.
2. Reconstitute the lyophilized reagents by adding 10 ml of buffer to D-luciferin and 12 ml to ATP vial.
3. Pipet samples into clean 96-well plate (Lumitrac 200), 20 µl per well (one well for each sample).

**Note 1: first line of each plate is used for background measurement. Instead of samples, pipet lysis buffer in these wells.**

**Note 2. Samples with expected very high CPU counts (raw CPU counts >5000) should be positioned last in plate to avoid interference with lower count results.**

28.08.2012

*Luc analysis plate map*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B	sample 1	sample 2	sample 3	sample 4	sample 5	sample 6	sample 7	sample 8	sample 9	sample 10	sample 11	sample 12
C	sample 13	sample 14	sample 15	sample 16	sample 17	sample 18	sample 19	sample 20	sample 21	sample 22	sample 23	sample 24
D	sample 25	sample 26	sample 27	sample 28	sample 29	sample 30	sample 31	sample 32	sample 33	sample 34	sample 35	sample 36
E	sample 37	sample 38	sample 39	sample 40	sample 41	sample 42	sample 43	sample 44	sample 45	sample 46	sample 47	sample 48
F	sample 49	sample 50	sample 51	sample 52	sample 53	sample 54	sample 55	sample 56	sample 57	sample 58	sample 59	sample 60
G	sample 61	sample 62	sample 63	sample 64	sample 65	sample 66	sample 67	sample 68	sample 69	sample 70	sample 71	sample 72
H	sample 73	sample 74	sample 75	sample 76	sample 77	sample 78	sample 79	sample 80	sample 81	sample 82	sample 83	sample 84

4. Add 100 µL of reconstituted D-luciferin per well with multichannel pipet (if applicable). Do not touch well edges and avoid bubbles. Cover with foil and let shake gently for a couple of minutes while starting up Victor. Store the remaining reagents labeled with date in -20°C.

*Note: The reconstituted reagents are stable for 1 month at -20 °C. Don't use ATP substrate from one kit lot with luciferin substrate from another kit lot.*

5. Victor<sup>2</sup> Multilabel Counter at Dept. of Physiology is used for the assays (need to be reserved). Open Victor and select using "UTU163" measurement protocol. Select dispenser maintenance and flush dispenser with dist water, empty dispenser, and place the tube in ATP solution. Fill dispenser with ATP solution. Make sure the tube reaches at the bottom of the APT solution vial.
6. Place the 96-well plate without the foil in the plate holder and start program "UTU163" by using "wizard". Select the wells you want to measure (as "measured"). Analysis of one full plate takes approx. 30 min.
7. Remove the plate. Select dispenser maintenance and empty the ATP solution from the tubes into ATP vial. Place the tubes into dist. water and flush. Leave tube to dist. water.

*Note: The analyzed plates are left in hood to dry out. Dried plates are discarded with solid waste.*

### 50 x TAE buffer, pH 8,0

For 100 ml

- TRIS 24,2 g
- 10 ml 0.5 M EDTA
- 5,71 ml Acetic acid
- dist. water up to 100 ml\*.

⇒ \*Check pH prior filling up to total volume and adjust with acetic acid if needed.

### 0,5 M EDTA, pH 8.0

55,83 g EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid, Na<sub>2</sub>EDTA x 2 H<sub>2</sub>O)  
add 200 ml dist. H<sub>2</sub>O

Adjust pH to 8.0 with 10 N NaOH. EDTA is difficult to dissolve; NaOH should be added enough (about 15 ml) to get EDTA dissolved (takes time!). pH can be adjusted to 8,0 after dissolving EDTA completely. Add dist. H<sub>2</sub>O up to 300 ml.

28.08.2012

### Protein analysis of tissue homogenates/ BCA kit (Pierce)

- Tissue homogenate samples need to be diluted for protein analysis depending on the expected protein content. Usually 10 – 50 x dilution into PBS is used.
- Thaw frozen samples on ice. Prepare dilutions and keep the diluted samples on ice.
- 100 mg of BSA (bovine serum albumin) in PBS is used as reference. Stock can be stored aliquoted in -20°C.
- Use round bottom clear 96-well plates for analysis

Prepare following standards (serial dilution) into appropriate solution (content of lysis buffer in PBS similar as in final diluted samples to be analyzed).

- 1) 2 mg/ml = 20 µl of stock (100 mg/ml BSA) + 980 µl PBS+lysis buffer
- 2) 1,5 mg/ml = 750 µl of dilution 1 + 250 µl PBS+lysis buffer
- 3) 1 mg/ml = 667 µl of dilution 2 + 333 µl PBS+lysis buffer
- 4) 750 µg/ml = 750 µl of dilution 3 + 250 µl PBS+lysis buffer
- 5) 500 µg/ml = 667 µl of dilution 4 + 333 µl PBS+lysis buffer
- 6) 250 µg/ml = 500 µl of dilution 5 + 500 µl PBS+lysis buffer
- 7) 125 µg/ml = 500 µl of dilution 6 + 500 µl PBS+lysis buffer
- 8) 25 µg/ml = 200 µl of dilution 7 + 800 µl PBS+lysis buffer

- Prepare needed volume of working reagent (WR) by using A and B solutions in ratio of 50:1 (A:B). The solutions A and B are provided in BCA kit.

**Note: excess of WR solution is absorbed into paper towels and discarded.**

- Pipette 25 µl of each standard or unknown sample replicates into a microplate well.
- The order of samples in plate is as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	STD 8	STD 8	STD 7	STD 7	STD 6	STD 6	STD 5	STD 5	STD 4	STD 4
B	STD 3	STD 3	STD 2	STD 2	STD 1	STD 1	Unk 1	Unk 1	Unk 2	Unk 2	Unk 3	Unk 3
C	Unk 4	Unk 4	Unk 5	Unk 5	Unk 6	Unk 6	Unk 7	Unk 7	Unk 8	Unk 8	Unk 9	Unk 9
D	Unk 10	Unk 10	Unk 11	Unk 11	Unk 12	Unk 12	Unk 13	Unk 13	Unk 14	Unk 14	Unk 15	Unk 15
E	Unk 16	Unk 16	Unk 17	Unk 17	Unk 18	Unk 18	Unk 19	Unk 19	Unk 20	Unk 20	Unk 21	Unk 21
F	Unk 22	Unk 22	Unk 23	Unk 23	Unk 24	Unk 24	Unk 25	Unk 25	Unk 26	Unk 26	Unk 27	Unk 27
G	Unk 28	Unk 28	Unk 29	Unk 29	Unk 30	Unk 30	Unk 31	Unk 31	Unk 32	Unk 32	Unk 33	Unk 33
H	Unk 34	Unk 34	Unk 35	Unk 35	Unk 36	Unk 36	Unk 37	Unk 37	Unk 38	Unk 38	Unk 39	Unk 39

- Add 200 µl of the WR to each well and mix plate thoroughly on plate shaker for 30 sec.
- Cover plate with parafilm and incubate at +37°C for 30 min.
- Cool plate to RT

When using device at Physiology:

- Open Multicalc on Victor<sup>2</sup> and go to "E protocol edit". Select from the list program "99 BCA2" and enter this program. Scroll down the program parameters and at the end wait until "Quit and Save" appears as option for functions. Quit and Save and leave the Multicalc open.
- Open Victor<sup>2</sup> and select "BCA2" program. Start Wizard and create the plate map you want to analyze (STDs and blanks are ready programmed. Select the sample wells to be measured).
- Continue to start the program.

**Note: The program will give an error notice if wrong filter wheel is installed. If this happens, change the wheel and start BCA2 wizard again.**

**Note: The analyzed plates are left in hood next to Victor equipment to dry out. Dried plates are discarded with solid waste.**

Kaisa Ivaska  
University of Turku / Cell biology and anatomy

23.3.2011

### MESENCHYMAL STROMAL CELL CULTURE FROM BONE MARROW

#### MSC-MEDIUM (100ml)

15 ml	iFBS	final conc. 15%
1 ml	PS (stock 100x)	final conc. 1x
1 ml	glutamax (stock 100x)	final conc. 1x
1 ml	HEPES (stock 1M)	final conc. 10 mM
82 ml	alphaMEM	

Cat# 41061-029

+ dex  $10^{-8}M$   
1  $\mu g/ml$  fungizone  
(Antibiotic 2nd)  
in to tube  
2+

1. Sacrifice animals, usually 1-3 animals is usually enough, depending on the age and species (rat vs mouse) (suggestions: ~8-12 week old NMRI or C57bl mice; ~3 week old SD rats)
2. Spray the fur coat with ethanol and remove fur from the legs. Spray soft tissues with ethanol and dissect femur and tibia (= 4 bones / animal). Put the dissected bones in PBS and remove excess soft tissue by scraping the bones with scalpel.
3. Take bones to cell culture hood and dip bones quickly to ethanol and transfer to sterile PBS. Remove any remaining soft tissue. When bones are clean, place the bones on a petri dish which contains medium.
4. Remove the epiphysis by cutting the bones at the metaphysis. Flush bone marrow from diaphysis using syringe and 27G needle and collect the bone marrow cells into 50ml Falcon tube.
5. Collect cells by centrifugation (1000rpm 8min). Resuspend the cell pellet in 2 ml medium. Pass cell suspension through 22G needle to break the aggregates (note: use pipet to put the cells into the syringe, do not aspirate through the needle).
6. Count the cell density (usually 1:10 - 1:40 dilution is suitable) and calculate the obtained cell number. *in 2% Acetic acid*
7. Plate cells in T25 (or T75) cell culture flasks at the density of  $1 \times 10^6$  cells /  $cm^2$ . Add medium to the final volume of 5 ml (or 13 ml). Medium should contain  $10^{-8}M$  dexamethasone (Dex).
8. After 48 hours, remove medium completely, wash the adherent cells twice with sterile PBS (to remove erythrocytes, non-adherent cells and dead cells) and replace with new medium.
9. Let cells grow undisturbed for 5 days (=total culture time 7 days from isolation). Trypsinize cells, centrifuge 800 rpm 5 min, count cell density and use MSCs for the desired experiment.

- USA (serum) - must be!  
- yeast?